

PRIMERJAVA METOD ZA IZOLACIJO RNA IZ KORENIN IN LISTOV HMELJA ZA ANALIZE IZRAŽANJA GENOV Z METODO RT-qPCR

Ester STAJIČ¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 23. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 16. 11. 2023

Izvleček

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvodomna zeljnata trajnica in ovijalka, ki ima pomembno vlogo v pivovarski industriji. Ker je gostiteljska rastlina številnih škodljivih organizmov, so raziskave na nivoju RNA ključne za razumevanje odziva rastlin na patogene in mehanizmov odpornosti na bolezni. Pridobivanje zadostnih količin visokokvalitetne RNA za molekularne analize pa je pri rastlinah zaradi prisotnosti metabolitov, kot so fenoli in polisahardi, pogosto oteženo. V ta namen smo primerjali pet različnih postopkov za izolacijo RNA iz listov in korenin hmelja, od tega dva komercialno dostopna kompleta za izolacijo RNA – Monarch Total RNA Miniprep kit (NEB) in Spectrum™ Plant Total RNA Isolation kit (Sigma-Aldrich), ter tri nekomercialne protokole. Pri vseh vzorcih smo s spektrofotometrom določili koncentracijo in čistost izolirane RNA. Z nekomercialnima metodama 'Hot borate' in CTAB smo dosegli najvišje koncentracije in čistost izolirane RNA tako pri listih, kot tudi pri koreninah hmelja. Pri analizi vzorcev z metodo RT-qPCR smo ugotovili, da so bili ti primerni za nadaljnje molekularne analize.

Ključne besede: hmelj, izolacija RNA, RT-qPCR

COMPARISON OF RNA ISOLATION METHODS FROM HOP ROOTS AND LEAVES FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS USING RT-qPCR

Abstract

Hops (*Humulus lupulus* L.) is a dioecious perennial climbing plant that plays an important role in the brewing industry. Since it is a host plant for many pathogens, research at the RNA level is critical to understand the plant's response to pathogens and mechanisms of disease resistance. Obtaining sufficient amounts of high-quality RNA for molecular analysis is often difficult in plants because they contain metabolites such as phenols and polysaccharides. For this purpose, we compared five different methods for RNA isolation from hop leaves and roots, including two commercially available kits for RNA isolation - Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB) and Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich); and three noncommercial protocols. For all samples, the concentration and purity of the isolated RNA was determined using a spectrophotometer. With the non-commercial 'Hot borate' and CTAB methods, we achieved the highest concentrations and purity

¹ Asist. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, e-naslov: ester.stajic@bf.uni-lj.si

of isolated RNA in both leaves and roots of hops. When the samples were analysed using the RT-qPCR method, we found that they were suitable for further molecular analysis.

Key words: hop, RNA isolation, RT-qPCR

1 UVOD

Rastline se odzivajo na zunanje dejavnike, kot so sprememba temperature, suša ali napadi škodljivcev in se na te spremembe prilagajajo z izražanjem različnih genov in sintezo metabolitov (Das in sod., 2013). Pri obvladovanju bolezni so zato za razumevanje mehanizma odziva rastline na okužbo s patogenom ključne raziskave na nivoju RNA. Za analizo izražanja genov se v zadnjih desetletjih najpogosteje uporablja metoda obratnega prepisa z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-qPCR). Analiza je sestavljena iz več korakov: izolacije RNA, odstranjevanja DNA, sinteze cDNA in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). Protokole, ki so na voljo, je običajno potrebno prilagoditi posamezni rastlinski vrsti, predvsem korak izolacije RNA (Moebes in sod., 2022).

Za izolacijo RNA iz rastlinskih tkiv se uporabljajo različne metode, ki temeljijo na uporabi gvanidin tiocionata, heksadeciltrimetilamonijevega bromida (CTAB) ali natrijevega dodecil sulfata (SDS) (Sasi in sod., 2023). Na voljo so tudi različni komercialno dosegljivi kompleti. Na uspešnost izolacije RNA vplivajo številni dejavniki, kot sta starost in fiziološko stanje rastlin, tip tkiva in biokemijski profil rastline. Predvsem slednji ima ključno vlogo, saj lahko prisotnost sekundarnih metabolitov negativno vpliva na izolacijo kvalitetne RNA zaradi njihove vezave na nukleinske kisline, kar vodi v obarjanje (Das in sod., 2013; Sasi in sod., 2023). Posledično je potrebno protokol izolacije RNA prilagoditi za posamezno rastlinsko vrsto in tip tkiva. Izolacija visoko kvalitetne RNA brez ostankov DNA je ključna za izvedbo številnih molekularnih metod na nivoju RNA, poleg metode RT-qPCR tudi za prenos po Northernu, sekvenciranje RNA, itd.

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je rastlina, bogata z bioaktivnimi snovmi, kot so eterična olja, hmeljeve smole in polifenoli. Zasledimo jih lahko predvsem v storžkih, ki se uporabljajo v pivovarski industriji in v farmacevtskih pripravkih (Hrnčič in sod., 2019), v manjših količinah pa jih lahko zasledimo tudi v listih (Abram in sod., 2015). Zaradi prisotnih sekundarnih metabolitov je izolacija RNA lahko otežena in rezultati molekularnih analiz nezanesljivi. Pri preučevanju verticilijske uvelosti hmelja, ki se začne s prehodom glive v podzemne dele rastline in nato napreduje v nadzemne, je ključna izolacija kvalitetne RNA iz korenin, ki pa so se večkrat pokazale za zahteven tip tkiva (Kolenc, 2022). S tem namenom smo primerjali pet različnih protokolov za izolacijo RNA iz listov in korenin hmelja. Uspešnost izolacije smo določili spektrofotometrično in izolirano RNA uporabili v reakciji RT-qPCR.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za izolacijo RNA smo uporabili vzorce listov in korenin hmelja, ki smo jih predhodno strli v terilnicah s pomočjo tekočega dušika in hranili v zmrzovalniku na -80°C . Za vsako od uporabljenih metod smo uporabili vzorce iz štirih rastlin hmelja in za izolacijo odvzeli po 100 ng materiala.

2.2 Izolacija RNA z različnimi metodami

V poskusu smo primerjali pet različnih metod za izolacijo RNA:

- komercialni komplet Monarch Total RNA Miniprep kit (NEB)
- komercialni komplet Spectrum™ Plant Total RNA Isolation kit (Sigma-Aldrich)
- CTAB protokol (Kump in Javornik, 1996)
- 'Hot borate' protokol (Gudenschwager in sod., 2012)
- modificiran CTAB protokol (CTAB-LiCl) (Kistner in Matamoros, 2005).

Izolacijo RNA smo izvedli po navodilih proizvajalca (komercialni kompleti) oz. po postopku, objavljenem v zgoraj navedenih objavah (nekomercialni protokoli). Izolirano RNA smo do nadaljnje uporabe hranili v zmrzovalniku na -80°C .

2.3 Odstranjevanje DNA

Da bi se izognili kontaminaciji vzorcev z genomsko DNA, smo vse vzorce tretirali z DNazo. Pri komercialnih kompletih (NEB in Sigma-Aldrich) je ta korak že vključen v samem protokolu med izolacijo, pri ostalih pa smo odstranjevanje DNA izvedli po zadnjem koraku izolacije. Pri tem smo uporabili komercialni komplet Rnase-Free Dnase Set (Qiagen) in sledili navodilom proizvajalca.

2.4 Določanje koncentracije in kvalitete RNA

Koncentracijo izolirane RNA smo določili z uporabo spektrofotometra NanoVue™ (Healthcare Bio-Sciences), ki izmeri absorbanco pri 230, 260 in 280 nm. Na podlagi podanih razmerij absorbanc $A_{260}/280$ in $A_{260}/230$ smo ovrednotili čistost izolirane RNA. Za preverjanje kakovosti smo 500 ng RNA nanесли na 1,2 % agarozni gel. Ločene fragmente smo po eni uri vizualizirali na podlagi barvila etidijev bromid na UV transiluminatorju.

2.5 RT-qPCR

Obratni prepis smo izvedli s komercialnim kompletom High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) po navodilih proizvajalca v cikličnem termostatu SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems™). Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca s Fast

SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™). V reakciji smo uporabili 10 ng cDNA in začetne oligonukleotide, specifične za gen *DRH1*, ki se pri hmelju uporablja kot referenčni gen pri analizi izražanja genov z metodo RT-qPCR (Štajner in sod., 2013). Za vsak vzorec smo uporabili tri tehnične ponovitve. Rezultate smo analizirali s programskim orodjem QuantStudio™ Design & Analysis Software.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

Analize izražanja genov imajo velik pomen na številnih področjih bioloških raziskav, saj dajejo vpogled v obrambni mehanizem rastlin na različne dejavnike biotskega in abiotskega stresa. Za natančno preučevanje izražanja genov je izolacija kvalitetne RNA ključna, kar pa je pri rastlinah zaradi prisotnosti sekundarnih metabolitov velikokrat težavno (Behnam in sod., 2018). Hmelj je rastlina, bogata z bioaktivnimi komponentami, ki lahko negativno vplivajo na uspešnost izolacije RNA, zato smo za izolacijo RNA iz vzorcev listov in korenin hmelja uporabili pet različnih postopkov, ter jih med seboj primerjali glede na koncentracijo, čistost in nerazgrajenost RNA, ter na koncu tudi preverili, ali je izolirana RNA primerna za nadaljnje molekularne analize.

Koncentracijo izolirane RNA smo določili z uporabo spektrofotometra z merjenjem absorbance pri 260 nm. Pri vseh vzorcih smo odstranili genomsko DNA, zato ta ni imela vpliva na izmerjeno absorbanco. Pri vseh izbranih metodah izolacije smo imeli enako količino začetnega materiala, prav tako smo RNA na koncu raztopili v enakem volumnu, zato je bilo mogoče uspešnost izolacije med različnimi metodami neposredno primerjati. Najvišje koncentracije smo dobili z nekomercialnim protokolom 'Hot borate', ki je bil optimiziran za izolacijo RNA iz sadežev, bogatih z različnimi metaboliti (Gudenschwager in sod., 2012). Izmerjena povprečna koncentracija RNA pri vzorcih listov hmelja je bila 1098 ng/μl, pri koreninah pa 419 ng/μl (Preglednica 1).

Preglednica 1: Koncentracija in čistost RNA, izolirana iz korenin in listov hmelja z različnimi metodami.

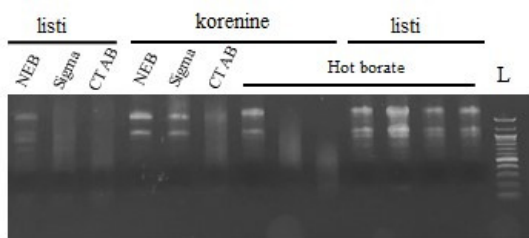
Metoda	Tkivo	Koncentracija RNA (ng/μl)	A260/280	A260/230
NEB	korenine	143 ± 42	2,05 ± 0,04	1,65 ± 0,39
	listi	375 ± 247	2,09 ± 0,05	1,70 ± 0,66
Sigma-Aldrich	korenine	113 ± 42	1,75 ± 0,38	0,87 ± 0,46
	listi	361 ± 311	2,00 ± 0,26	1,46 ± 0,89
CTAB	korenine	341 ± 212	2,21 ± 0,02	2,09 ± 0,72
	listi	655 ± 440	2,18 ± 0,03	2,11 ± 0,53
Hot borate	korenine	419 ± 178	2,15 ± 0,01	2,14 ± 0,46
	listi	1098 ± 239	2,14 ± 0,01	2,42 ± 0,03
CTAB-LiCl	korenine	131 ± 135	1,44 ± 0,14	0,35 ± 0,07
	listi	76 ± 31	1,20 ± 0,10	0,21 ± 0,05

Visoke koncentracije RNA smo pridobili tudi po protokolu CTAB (listi 655 ng/ μ l, korenine 341 ng/ μ l), medtem ko smo s komercialnima kompletoma pridobili veliko nižje koncentracije RNA (korenine 113 ng/ μ l in 143 ng/ μ l, listi 361 ng/ μ l in 375 ng/ μ l). Protokoli na osnovi CTAB z različnimi modifikacijami so se izkazali za primerne za izolacijo visokokakovostne RNA iz težavnih rastlinskih tkiv (Johnson in sod., 2012). V našem primeru smo preizkusili dva protokola na osnovi CTAB – protokol po Kump in Javornik (1996) ter modificiran protokol po Kistner in Matamoros (2005), vendar smo s slednjim dobili 3-8x nižje koncentracije kot s prvim.

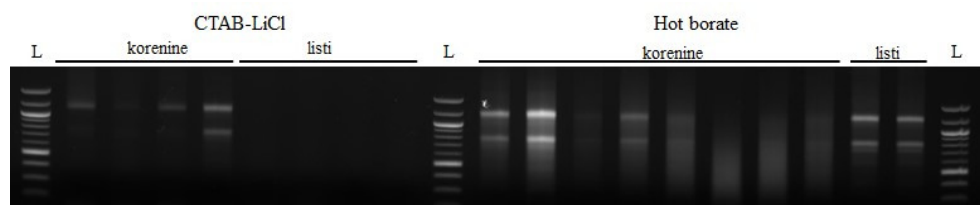
Če primerjamo uspešnost izolacije RNA iz dveh različnih tkiv (korenine in listi), lahko ugotovimo, da so koncentracije RNA pri vseh metodah, razen pri CTAB-LiCl (kjer so bile koncentracije pri obeh tipih tkiva nizke), pričakovano višje pri listih kot pri koreninah. Korenine so se izkazale za težavne pri številnih rastlinskih vrstah (Das in sod., 2013; Kistner in Matamoros, 2005), zato se za izolacijo RNA priporočajo mladi listi, ki vsebujejo najmanj inhibitornih komponent (Sasi in sod., 2023). Kljub temu ima uspešna izolacija RNA iz korenin velik pomen, predvsem pri preučevanju bolezni, ki se začnejo v podzemnih delih rastlin.

Z razmerjem izmerjenih absorbanc A260/A280 in A260/A230 smo lahko ovrednotili tudi čistost izolirane RNA. Priporočljive vrednosti so po Unger in sod. (2019) za razmerje A260/A280 \sim 2,0 in A260/A230 med 1,8 in 2,2. Kot je razvidno iz Preglednice 1, vsi vzorci, razen tistih, pridobljenih z metodo CTAB-LiCl (korenine in listi) ter vzorci RNA iz korenin, ki je bila izolirana s kompletom Sigma-Aldrich, ustrezajo prvemu pogoju, medtem ko imajo omenjeni vzorci nižje razmerje A260/A280, kar lahko nakazuje na ostanke proteinov (Gudenschwager in sod., 2012). Pri razmerju A260/A230 smo vrednosti, ki kažejo na visoko čistost RNA dosegli le z uporabo protokolov CTAB in 'Hot borate'. Pri ostalih metodah so bile vrednosti nižje, kar pomeni, da so bile v vzorcih RNA prisotne nečistoče. Če primerjamo rezultate glede na tip tkiva, lahko ugotovimo, da med vzorci RNA iz korenin ali listov ni večjih razlik v čistosti, razen pri komercialnem kompletu Sigma-Aldrich, kar je v nasprotju s pričakovanim.

Da bi ocenili kvaliteto izolirane RNA smo od vsake kombinacije (metoda izolacije in tip tkiva) naključno izbrane vzorce nanесли na 1,2 % agarozni gel. V primeru nerazgrajene RNA smo na gelu videli dva lepo vidna fragmenta 18S in 28S ribosomalne RNA (rRNA). Takšen primer so vzorci RNA iz korenin, ki je bila izolirana s komercialnima kompletoma, medtem, ko smo s protokolom CTAB dobili zelo razgrajeno RNA, brez vidnih fragmentov 18S in 28S rRNA (Slika 1). Pri protokolu 'Hot borate' smo opazili velike razlike v kvaliteti RNA med vzorci korenin (Slika 1 in 2). Vzrok bi lahko bila homogenizacija tkiva, ki je pri koreninah otežena, daljši čas, ki ga potrebujemo za učinkovito homogenizacijo pa lahko vodi v segrevanje vzorcev in sproščanje nukleaz, kar povzroči razgradnjo RNA (Moebes in sod., 2022). Pri protokolu CTAB-LiCl je bila koncentracija RNA nizka, zato pri listih kvalitete RNA nismo mogli oceniti, medtem ko je bila kvaliteta RNA pri vzorcih korenin visoka.

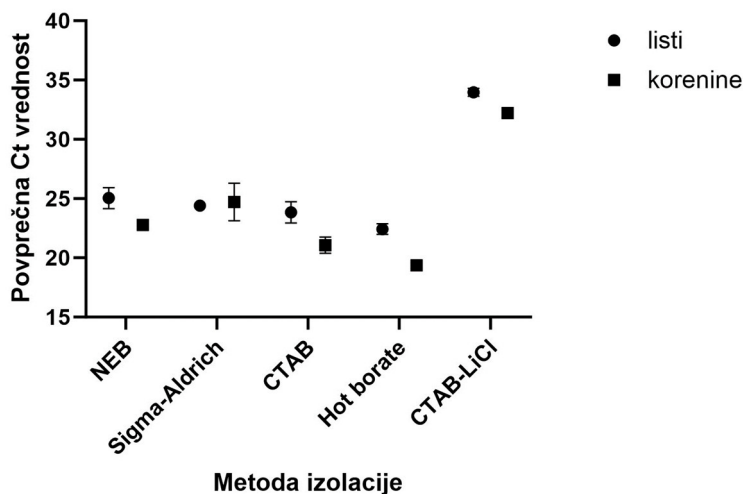


Slika 1: Agarozni gel vzorcev RNA, izoliranih iz korenin in listov hmelja s komercialnima kompletoma (NEB in Sigma-Aldrich) ter po CTAB in 'Hot borate' protokolu. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).



Slika 2: Agarozni gel vzorcev RNA, izoliranih iz korenin in listov hmelja po CTAB-LiCl in 'Hot borate' protokolu. L: 100 bp DNA Ladder (NEB).

Ker nas je zanimalo, ali je izolirana RNA primerna za nadaljnje molekularne analize, smo jo prepisali v cDNA in izvedli qPCR z začetnimi oligonukleotidi za gen *DRH1*, ki je bil zaradi stabilnega izražanja izbran za referenčni gen pri hmelju v študiji Štajner in sod. (2013). Kot prikazuje Slika 3, smo pri vseh vzorcih gen *DRH1* uspešno pomnožili. Višje Ct vrednosti (33,97 listi in 32,22 korenine) pri vzorcih RNA, ki je bila izolirana po protokolu CTAB-LiCl, so lahko posledica prisotnosti nečistoč, kot so sekundarni metaboliti, ki lahko inhibirajo delovanje reverzne transkriptaze med obratnim prepisom (Johnson in sod., 2012) in polimeraze med pomnoževanjem v qPCR reakciji (Unger in sod., 2019). Enako navajajo tudi Deepa in sod. (2014) pri izolaciji RNA iz več tipov tkiv kurkume. Povprečne Ct vrednosti pri ostalih metodah so se gibale med 19,36 in 25,05 ter se med vzorci korenin in listov pri vseh preizkušanih metodah niso bistveno razlikovale.



Slika 3: Rezultat analize RT-qPCR prikazan kot povprečne Ct vrednosti pri vseh RNA vzorcih.

4 ZAKLJUČEK

Pri študijah izražanja genov je izolacija kakovostne RNA iz rastlinskega tkiva ključen korak, ta pa je v veliki meri odvisna od rastlinskega materiala, zato je protokol izolacije RNA potrebno prilagoditi posamezni rastlinski vrsti in tipu tkiva. V ta namen smo primerjali uspešnost izolacije RNA iz listov in korenin hmelja z različnimi metodami. Ugotovili smo, da so bile razlike tako v koncentraciji, čistosti in kvaliteti izolirane RNA med različnimi metodami in tipoma tkiva, vendar pa so bili vsi vzorci, razen tistih, pridobljenih z metodo CTAB-LiCl, primerni za nadaljnjo analizo z metodo RT-qPCR. Za molekularne metode, pri katerih so potrebne večje količine RNA (npr. sekvenciranje RNA), pa tako za liste, kot tudi za korenine hmelja priporočamo uporabo nekomercialnih protokolov 'Hot borate' in CTAB.

Zahvala. Avtorica se za finančno podporo zahvaljujem Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077). Za tehnično pomoč se zahvaljujem dr. Urbanu Kuneju in Tjaši Cesar. Zahvala za pomoč pri delu gre tudi dijakoma Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana Maticu Krašni in Filipu Gromu ter študentki Biotehniške fakultete Emanueli Žnidaršič.

5 VIRI

Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Možina S. S., Košir J. I., Kač M., Demšar L., Poklar Ulrih N. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*. 2015; 64: 124–134.

- Behnam B., Bohorquez-Chaux A., Castaneda-Mendez O.F., Tsuji H., Ishitani M., Becerra Lopez-Lavalle, L.A. An optimized isolation protocol yields high-quality RNA from cassava tissues (*Manihot esculenta* Crantz). *FEBS Open Bio*. 2019; 9: 814–825.
- Das A., Saha D., Mondal T.K. An optimized method for extraction of RNA from tea roots for functional genomics analysis. *Indian Journal of Biotechnology*. 2013; 12: 129–132.
- Deepa K., Sheeja T.E., Santhi R., Sasikumar B., Cyriac A., Deepesh P.V., Prasath D. A simple and efficient protocol for isolation of high quality functional RNA from different tissues of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Physiol Mol Biol Plants*. 2014; 20, 2: 263–271.
- Gudenschwager O., González-Agüero M., Defilippi B.G. A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits. *South African Journal of Botany*. 2012; 83 186–192.
- Hrnčič M. K., Spaninger E., Košir I. J., Knez Z., Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*. 2019; 11, 2: 275.
- Johnson M. T. J., Carpenter E. J., Tian Z., Bruskiwich R., Burris J. N., Carrigan C. T., Chase M. W., Clarke N. D., Covshoff S., dePamphillis C. W., Edger P. P., Goh F., Graham S., Greiner S., Hibberd J. M., Jordon-Thaden I., Kutchan T. M., Leebens-Mack J., Mlekonian M., Miles N., Myburg H., Patterson J., Pires J. C., Ralph P., Rolf M., Sage R. F., Soltis D., Soltis P., Stevenson D., Stewart Jr C. N., Surek B., Thomsen C. J. M., Villarreal J. C., Wu X., Zhang Y., Deyholos M. K., Wong G. K. Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLOS ONE*. 2012; 7, 11: e50226.
- Kolenc Ž. Analiza izražanja mikroRNA in njihovih tarč v obrambnem odzivu hmelja (*Humulus lupulus*) ob okužbi z glivo *Verticillium nonalfalfae*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2022, 54 str.
- Kistner C., Matamoros M. RNA isolation using phase extraction and LiCl precipitation. V: *Lotus japonicus Handbook*. Márquez A.J. (ur.). Springer, Dordrecht. 2005: 123–124.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*. 1996; 114: 149–158.
- Moebes M., Kuhlmann H., Demidov D., Lermontova I. Optimization of quantitative reverse transcription PCR method for analysis of weakly expressed genes in crops based on rapeseed. *Front. Plant Sci*. 2022; 13: 954976.
- Sasi S., Krishnan S., Kodackattumannil P., Shamisi A. A., Aldarmaki M., Lekshmi G., Kottackal M., Amiri K. M. A. DNA-free high-quality RNA extraction from 39 difficult-to-extract plant species (representing seasonal tissues and tissue types) of 32 families, and its validation for downstream molecular applications. *Plant Methods*. 2023; 19: 84.
- Štajner N., Cregeen S., Javornik B. Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop (*Humulus lupulus* L.) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*. *PLoS One*. 2013; 8, 7: e68228.
- Unger C., Lokmer N., Lehmann D., Axmann I. M. Detection of phenol contamination in RNA samples and its impact on qRT-PCR results. *Analytical Biochemistry*. 2019; 571, 49–52.